

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09299769  
PUBLICATION DATE : 25-11-97

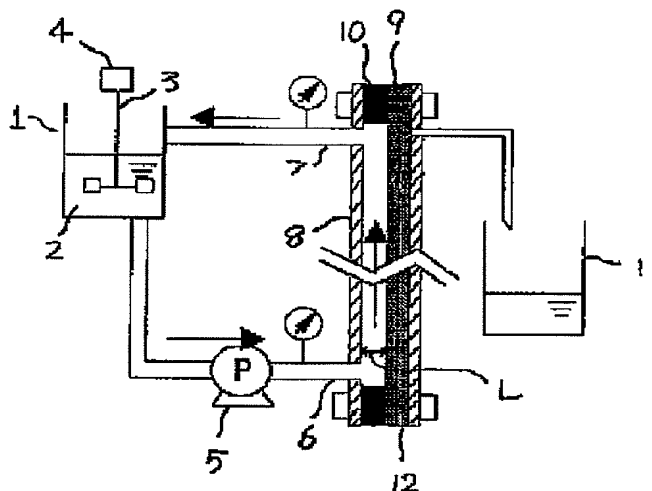
APPLICATION DATE : 14-05-96  
APPLICATION NUMBER : 08144972

APPLICANT : KAO CORP;

INVENTOR : TANAKA TAKEKUNI;

INT.CL. : B01D 63/08 B01D 61/14 C12N 9/42 //  
C12N 1/02 (C12N 9/42 , C12R 1:07  
) , (C12N 1/02 , C12R 1:07 )

TITLE : METHOD OF RECOVERING  
FERMENTED PRODUCTS



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the permeated flow flux and the recovery rate of fermented products in a fermentation liquid by using a culture cell separation membrane having a membrane pore diameter of specific times the size of culture cells.

SOLUTION: A culture cell separation membrane 9 of a flat membrane type filter 8 is a precision filter membrane made of polytetrafluoroethylene 110mm long, 60mm wide and 50cm<sup>2</sup> in effective area. The section of a flow passage in the device 8 in which the separation membrane 9 is installed is 50mm wide and a flow passage spacing L is 1mm. A fermentation liquid is fed by a circulating pump 5 and filtration pressure and membrane surface velocity are set at 0-5kgf/cm<sup>2</sup> and 0-2m/s, respectively.

Solution which has permeated the separation membrane 9 is passed through a porous separation membrane supporting body 12 and is housed in a housing vessel 11 made of stainless steel. The pore diameter of the separation membrane 9 used in the filter 8 is the so-called nominal one and is 2-20 times the size of culture cells, and is normally 1-10μm. As a result, the culture cells are effectively separated from the fermentation liquid to recover fermented products with a high recovery rate.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-299769

(43) 公開日 平成9年(1997)11月25日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 D 63/08			B 0 1 D 63/08	
61/14	5 0 0		61/14	5 0 0
C 1 2 N 9/42			C 1 2 N 9/42	
// C 1 2 N 1/02			C 1 2 N 1/02	
(C 1 2 N 9/42				

審査請求 未請求 請求項の数 5 F I (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-144972

(22) 出願日 平成8年(1996)5月14日

(71) 出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

(72) 発明者 小松 利照

和歌山市湊1334番地 花王株式会社研究所  
内

(72) 発明者 上野山 慎児

和歌山市湊1334番地 花王株式会社研究所  
内

(72) 発明者 田中 猛訓

和歌山市湊1334番地 花王株式会社研究所  
内

(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 発酵生産物の回収方法

(57) 【要約】

【解決手段】平膜型濾過装置を用いて、培養細胞と培養細胞が分泌する発酵生産物とを含有する発酵液から培養細胞を分離し、発酵生産物を回収する方法であって、培養細胞の大きさの2~20倍の膜孔径を有する培養細胞分離膜を用いることを特徴とする発酵生産物の回収方法。

【効果】本発明により、膜面上に不溶解物質が付着、堆積することを防止しつつ、発酵液から培養細胞を効率的に分離し、発酵生産物を高回収率で回収することが可能となる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 平膜型濾過装置を用いて、培養細胞と培養細胞が分泌する発酵生産物とを含有する発酵液から培養細胞を分離し、発酵生産物を回収する方法であって、培養細胞の大きさの2～20倍の膜孔径を有する培養細胞分離膜を用いることを特徴とする発酵生産物の回収方法。

【請求項2】 培養細胞の大きさの5～20倍の膜孔径を有する培養細胞分離膜を用いることを特徴とする請求項1記載の回収方法。

【請求項3】 膜孔径が1～10 $\mu$ mである請求項1又は2記載の回収方法。

【請求項4】 膜孔径が5～10 $\mu$ mである請求項1又は2記載の回収方法。

【請求項5】 平膜型濾過装置の流路間隔が0.3～10mmである請求項1～4いずれか記載の回収方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は発酵生産物、すなわち、例えば微生物が有機物を分解し、その代謝物として蓄積される生産物を発酵液から回収する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】発酵液をそのまま濾過し、発酵液中の微粒子、培養細胞および胞子などの不溶解物質を除去して目的とする酵素等の発酵生産物を回収する方法は公知である。ところが、濾過操作中に分離膜細孔の大きさに近い粒子によって分離膜の目詰まりを起し、さらに膜面上に不溶解物質が堆積し、濾過効率の低下を招くことが問題となる。従来、こうした分離膜の物理的目詰まりや膜面上の不溶解物質の堆積に対し、濾過使用膜面積を大きくしたり、プレフィルタを用いたり、膜面上を掃流しながら濾過を行う等の操作により、目詰まりや不溶解物質の堆積を避けていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】このような問題点に対し、一般的な方法として、発酵液に凝集剤を添加した後、該発酵液を公知の加圧濾過機、あるいは真空濾過機等で濾過した後、さらに精密濾過により発酵生産物を回収する方法が知られている。しかしながら、この方法では、複数の工程を経るため時間がかかり、また工程が多い為に発酵液中の発酵生産物の回収率が低下する等の問題があり、全工程の効率は良いものとは言えない。

【0004】工程数を低減させるために膜面上の掃流機構を付与した濾過装置として、実開昭62-130703号公報等に記載されている膜自体を回転させて行う方法や特開平5-115758号公報等に記載されている膜面上で攪拌翼を回転させて行う方法がある。しかし、これらの方法では、培養細胞等の不溶解物質の分離膜の目詰まりや膜面上の堆積については改善されるものの、発酵液中の高分子物質等の閉塞要因物質が膜を閉塞さ

せ、発酵液の膜濾過速度が遅くなる場合や発酵液中の発酵生産物の回収率が低下するが多い。従って、微粒子、培養細胞、胞子等の不溶解物質を含む発酵液中から目的とする発酵生産物を効率よく、高回収率で得る方法は未だ見出されていないのが現状であった。

【0005】本発明は、このような課題を解決すべく考えられたものであり、本発明の目的は透過流束ならびに発酵液中の発酵生産物の回収率を向上させる発酵生産物の回収方法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、特定の濾過装置を用いて培養細胞を分離し、発酵液中の発酵生産物を回収することに着目し、鋭意検討した結果、本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明の要旨は、(1) 平膜型濾過装置を用いて、培養細胞と培養細胞が分泌する発酵生産物とを含有する発酵液から培養細胞を分離し、発酵生産物を回収する方法であって、培養細胞の大きさの2～20倍の膜孔径を有する培養細胞分離膜を用いることを特徴とする発酵生産物の回収方法、(2) 培養細胞の大きさの5～20倍の膜孔径を有する培養細胞分離膜を用いることを特徴とする前記(1)記載の回収方法、

(3) 膜孔径が1～10 $\mu$ mである前記(1)又は(2)記載の回収方法、(4) 膜孔径が5～10 $\mu$ mである前記(1)又は(2)記載の回収方法、(5) 平膜型濾過装置の流路間隔が0.3～10mmである前記(1)～(4)いずれか記載の回収方法に関するものである。

## 【0008】

【発明の実施の形態】本発明の回収方法の対象となる発酵液は、例えば細菌、放線菌、カビ、酵母等の微生物を培養したものでも良く、動物あるいは植物の細胞を培養したものでも良い。具体的には、アルコール発酵、醤油、食酢等の食品発酵、抗生物質および抗ガン物質の発酵、有機酸発酵、アミノ酸発酵等が挙げられる。

【0009】本発明で使用される平膜型濾過装置とは、平膜形状の培養細胞分離膜を有する濾過装置をいう。例えば、図1に示す形状のものが挙げられる。本発明においては特に限定されるものではないが、例えば日東電工(株)製、プレート型精密濾過膜装置が使用できる。

【0010】膜の材質は例えば、アルミナ、チタニア、ジルコニア等のセラミック、ガラス、金属等の無機膜、または、酢酸セルロース系、ニトロセルロース系、脂肪族ポリアミド系、ポリスルホン系、ポリオレフィン系、ポリアクリロニトリル系、ポリエーテルスルホン系、ポリ塩化ビニル系、ポリビニルアルコール系、フッ素系高分子等の有機膜が挙げられ、セラミック膜、無機膜、ポリスルホン系高分子膜、フッ素系高分子膜が、膜洗浄時の薬液耐久性が大きい観点から、より好ましい。膜の厚さは特に限定されないが、50～1000 $\mu$ mがより好

ましい。

【0011】本発明における平膜型濾過装置に用いられる膜の孔径は、いわゆる公称孔径のことであり、バブルポイント法（JIS K-3822に記載の方法）で測定することができる。好ましい膜の孔径は、培養細胞の大きさの2～20倍であり、より好ましくは5～20倍、さらに好ましくは10～20倍である。膜の孔径は、通常1～10 $\mu$ mであり、好ましくは3～10 $\mu$ m、さらに好ましくは5～10 $\mu$ mである。ここで、微生物、動物細胞、植物細胞の大きさとは、これらの細胞をあらゆる角度から投影させた場合に、その細胞の投影面積が最小となる平面図形の長径（最長間隔）として定義される。

【0012】孔径が培養細胞の大きさの2倍未満であると、培養細胞や細胞の自己消化等により生成する高分子分離阻害物質等が分離膜に付着または堆積するために、膜透過流束が低下し、発酵生産物の回収率が低下する。また、孔径が培養細胞の大きさの20倍を超えると培養細胞の分離能が低下する傾向がある。ここで培養細胞の分離能とは、発酵液から回収する発酵生産物中への培養細胞の漏れを阻止する能力のことであり、95～100%が好ましく、98～100%がより好ましい。

【0013】また、培養細胞の分離能が100%要求される場合には、本発明の方法により発酵生産物をまず高回収率で得た後、培養細胞よりも小さい膜孔径の分離膜を用いてさらに濾過することによって100%の培養細胞を分離する方法を行っても良い。

【0014】操作温度は、通常0～40℃であり、好ましくは5～30℃である。操作温度が0℃未満では発酵液の粘度が大きくなるため膜透過流束が低下することがあり、また40℃を超えると発酵液の性状が悪化し、好ましくない。

【0015】平膜型濾過装置においては、発酵液を循環させることにより膜面速度と圧力損失による膜間差圧（膜を介しての原液側と透過側との差圧）は同時に上昇する。膜面速度は大きいほどゲル層（膜閉塞物質が堆積した層）の剥離効果が増大し、膜間差圧は大きいほど透過流束が増大する。しかし膜間差圧が大きくなりすぎると膜近傍でのゲル層の圧密化が起こり、膜透過流束および発酵液中の発酵生産物の回収率が低下する。したがって膜間差圧には通常ある上限値が存在するが、流路断面積が大きいため従来の中空糸モジュール型に比べて小さい圧力損失で高膜面速度が達成できるという特徴を有する。また膜面速度と膜間差圧を独立に制御できる膜自体を回転させる方式や膜面上で攪拌翼を回転させる方式に比べて装置がコンパクトである。

【0016】本発明における膜間差圧は、入口と出口の平均膜間差圧をいい、通常4.0 kgf/cm<sup>2</sup> 以下が好ましく、より好ましくは0.2～3.0 kgf/cm<sup>2</sup> である。膜間差圧が0.2 kgf/cm<sup>2</sup> より小さいと透過流束が低下し、処理性が悪化する傾向がある。ま

た、膜間差圧が4.0 kgf/cm<sup>2</sup> を超えると膜面でのゲル層の圧密化等により膜閉塞が生じて透過流束が低下する場合があるので好ましくない。また、膜間差圧の与え方は、原液側加圧式、透過液側減圧式あるいは両者の組み合わせでも良い。

【0017】分離膜面上の掃流を行うための膜面速度は大きいほど膜面上の掃流効果が大きくなる。しかし、ある速度以上では、圧力損失が大きくなり、膜近傍でのゲル層の圧密化が起こり、膜透過流束および発酵液中の発酵生産物の回収率が低下する。また、速度が低過ぎると圧力損失は低下し、圧密化は回避されるが、ゲル層の剥離効果が低下し、膜透過流束および発酵液中の発酵生産物の回収率が低下する。実質的には膜面速度は1～3 m/sが適当である。

【0018】また、本発明で使用される平膜型濾過装置において、流路間隔とは、平膜面上に形成される発酵液流れの厚みであり、図1におけるLをいう。その流路の間隔は0.3～10 mmが適当であり、好ましくは0.5～5 mm、さらに好ましくは0.5～2 mmが適当である。流路の間隔が0.3 mmより小さいと高膜面速度を得るための圧力損失が増大し、膜近傍でのゲル層の圧密化が起こり、膜透過流束および発酵液中の発酵生産物の回収率が低下する場合がある。また、10 mmより大きいと圧力損失は小さくなるが、高膜面速度を得るための循環流量が増大し、経済性の上で問題となることがある。

【0019】本発明の方法による回収の対象となる発酵生産物とは、特に限定されるものではない。例えば、アンフォテリシン、バシトラシン、セファロスポリン、クロラムフェニコール、シクロヘキサマイド、エリスロマイシン、ゲンタマイシン、グラミシジン、グリセオフルビン、カナマイシン、ナタマイシン、ネオマイシン、ノボビオシン、ナイスチン、オレアンドマイシン、パラモマイシン、ペニシリン、ポリミキシン、リファマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、トリコマイシン、タイロシジン、タイロスライシン、タイロシン、バンコマイシン、バイオマイシン等の抗生物質、アミノ酸アシラーゼ、アミノ酸トランスアミナーゼ、アミラーゼ、アスパラギナーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、コラゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ類、デキストラナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、ヘミセルラーゼ、フラクトースグルコースイソメラーゼ、インベルターゼ、リパーゼ、リゾチーム、ペクチナーゼ、ペニシリンアシラーゼ、ペニシリナーゼ、プロテアーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトドナーゼ等の酵素、その他ビタミン類、多糖類、色素等が挙げられる。

【0020】

【実施例】以下、実施例および比較例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によ

りなら限定されるものではない。

#### 【0021】実施例1

以下の条件でバチルスエスピー KSM-635 (微工研条第1485号、昭和61年7月24日 (原寄託日)) を培養し、セルラーゼの生産を行い、該発酵液から本発明の方法により菌体を分離し、発酵生産物であるセルラーゼの回収を行った。培地は、肉エキス (Oxoid 社製) 3%、酵母エキス (Difco 社製) 0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を0.1%、 $\text{KCl}$  を1%、グルコース0.5%、フラクトース0.5%、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5%を混合溶解して調製した (%は重量%)。30リットル培養槽にこの培地を18リットル仕込み、24時間培養の種発酵液180mLを添加した。培養は、温度33℃、給気空気流量9Nリットル/分、攪拌速度400rpmの条件で30時間保持することにより行った。培養後の菌体濃度は、発酵液の波長600nmでの濁度で測定したところ、その値は吸光度で4.0であった。培養細胞の大きさを顕微鏡で測定したところ、0.5 $\mu\text{m}$ であった。

【0022】用いた濾過装置の構造を図1により説明する。培養細胞分離膜9は長さ110mm、幅60mm、有効面積50 $\text{cm}^2$ のポリテトラフルオロエチレン製の精密濾過膜である。分離膜を設置する装置内の流路断面は幅50mm、流路間隔Lは1mmであり、循環ポンプ5により供給され、濾過圧力は0~5 $\text{kgf/cm}^2$ 、膜面速度は0~2 $\text{m/s}$ の設定が可能である。上記の分離膜9を透過した溶液は、多孔質分離膜支持体12を通り、ステンレス製の集液容器11に集液される。

【0023】以上の濾過装置において、公称孔径が1 $\mu\text{m}$  ( $\text{膜孔径} D / (\text{培養細胞の大きさ} d) = 2$ ) の分離膜を用いて発酵生産物の回収操作を行った。まず、上記発酵液2.5リットルを濾過装置の液槽1に循環ポン

プ5にて導入し、循環を行った。発酵液は氷冷し15℃に保った。続いて循環量を3リットル/min. (膜面速度は1 $\text{m/s}$ ) に設定して透過液1.25リットルを得た (平均膜間差圧0.25 $\text{kgf/cm}^2$ )。

【0024】このとき、濾過液の流量、酵素含有量を測定し、透過流束 (下記式 (1)) および酵素回収率を算出した。酵素含有量は、濾過液1リットル当たりの酵素活性から算出した。酵素活性の測定は、次のように行った。CMCアーゼ活性 (セルラーゼ活性) は下に示す方法により測定し、緩衝液としては次のものを用いた。

pH8~11グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液

CMCアーゼ活性測定法: 10mg CMC (山陽国策パルプ社)、100 $\mu\text{mol}$  各種緩衝液 (グリシン-NaOH等) を含む基質溶液0.9mlに0.1mlの酵素溶液を加え、40℃、20分反応した。反応後、3,5-ジニトロサリチル酸 (3,5-dinitro-salicylic acid (DNS)) 法にて還元糖の定量を行った。すなわち、反応液1.0mlにDNS試薬1.0mlを加え、5分間、100℃で加熱発色させ、冷却後、4.0mlの脱イオン水を加えて希釈した。これを波長535nmで比色定量した。酵素力価は、上記の条件下で1分間に1 $\mu\text{mol}$ のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。酵素回収率は、下記式 (2) から求めた。また、培養細胞分離率は濾過液中の培養細胞量をコロニーカウント法 (培養細胞濃度が低い場合) による計測から算出、または波長600nmでの濁度 (培養細胞濃度が高い場合) を測定し、下記式 (3) を用いて算出した。

#### 【0025】

##### 【数1】

$$\text{透過流束 (L/m}^2 \text{ hr)} = \frac{\text{透過液量 (L)}}{\text{膜面積 (m}^2 \text{)} \cdot \text{濾過時間 (hr)}} \quad (1)$$

$$\text{酵 素 回 収 率 (\%)} = \frac{\text{濾過液活性 (単位)}}{\text{発酵液活性 (単位)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\left[ 1 - \frac{(\text{透過液濁度})}{(\text{原液濁度})} \right] \times 100 \quad (3)$$

#### 【0026】実施例2

分離膜の公称孔径を3 $\mu\text{m}$  ( $D/d=6$ ) とする以外は実施例1と全く同じ操作で行った。

#### 【0027】実施例3

分離膜の公称孔径を5 $\mu\text{m}$  ( $D/d=10$ ) とする以外は実施例1と全く同じ操作で行った。

#### 【0028】実施例4

分離膜の公称孔径を10 $\mu\text{m}$  ( $D/d=20$ ) とする以外は実施例1と全く同じ操作で行った。

#### 【0029】比較例1

分離膜の公称孔径を0.2 $\mu\text{m}$  ( $D/d=0.4$ ) とする以外は実施例1と全く同じ操作で行った。

【0030】以上の結果から、実施例1~4、比較例1に対して平均透過流束、酵素回収率および培養細胞分離

率を求めた。それを膜の公称孔径に対して点綴したものを図2に示す。図2から明らかなように、実施例1～4の酵素回収率は比較例1に比べて飛躍的に高い。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明により、膜面上に不溶解物質が付着、堆積することを防止しつつ、発酵液から培養細胞を効率的に分離し、発酵生産物を高回収率で回収することが可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

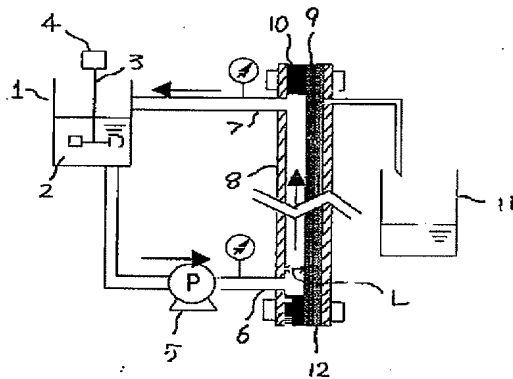
【図1】図1は、本発明における平膜型濾過装置の構成図の一例を示す図である。

【図2】図2は、実施例1～4、比較例1における平均透過流速、酵素回収率および培養細胞分離率を膜の公称孔径に対して点綴した結果を示す図である。

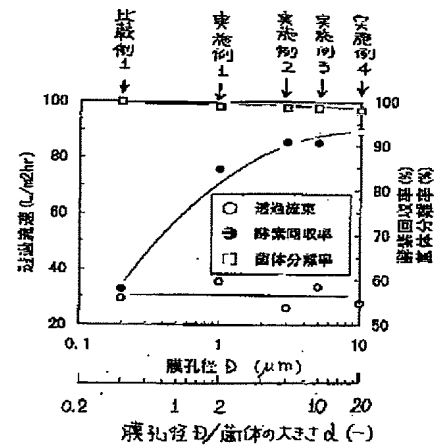
#### 【符号の説明】

- 1 液槽
- 2 発酵液
- 3 攪拌棒
- 4 攪拌モーター
- 5 循環ポンプ
- 6 発酵液入口
- 7 発酵液出口
- 8 平膜型濾過装置
- 9 培養細胞分離膜
- 10 パッキン
- 11 集液容器
- 12 多孔質分離膜支持体
- L 流路間隔

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 12 R 1:07)

(C 12 N 1/02

C 12 R 1:07)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

